

51457-2001800-10361


DELPHION

[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)

[RESEARCH](#)

[Products](#)

[INTEGRATION](#)

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help

The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: PDF | File History | Other choices

Tools: Add to Work File: Create new Work File Add

View: Jump to: [Top](#) Go to: [Derwent](#)

Email this to a friend

KR2046835A: INDIVIDUAL IDENTIFICATION AND PATERNITY TESTING METHODS BY OPTIMIZING MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION USING LENGTH POLYMORPHISM DNA NUCLEOTIDE SEQUENCE

Derwent Title: Individual identification and paternity testing methods by optimizing multiplex polymerase chain reaction using length polymorphism dna nucleotide sequence [Derwent Record]

Country: KR Republic of Korea

Kind: A Examined Patent Application

Inventor: RYU, JAE SONG; Republic of Korea SO, JAE SEOONG; Republic of Korea

Assignee: INHA UNIVERSITY Republic of Korea News, Profiles, Stocks and More about this company

Published / Filed: 2002-06-21 / 2000-12-15

Application Number: KR20000000077179

IPC Code: Advanced: C12Q 1/68;

Core: more...

IPC-7: C12Q 1/68;

ECLA Code: None

Priority Number: 2000-12-15 KR20000000077179
• DTWF0151: The execution of the system command failed at line 3140 with return code 512.

Family:	PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title

<input checked="" type="checkbox"/>	KR2046835A	2002-06-21	2000-12-15	INDIVIDUAL IDENTIFICATION AND PATERNITY TESTING METHODS BY OPTIMIZING MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION USING LENGTH POLYMORPHISM DNA NUCLEOTIDE SEQUENCE
1 family members shown above				

Other Abstract
Info:



Powered by **Verity**



Nominate this for the Gallery...



THOMSON

Copyright © 1997-2006 The Thomson Corporation
[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 공개특허공보 (A)

(51) Int. Cl.⁷
C12Q 1/68

(11) 공개번호 특2002 -0046835
(43) 공개일자 2002년06월21일

(21) 출원번호 10 -2000 -0077179
(22) 출원일자 2000년12월15일

(71) 출원인 학교법인 인하학원
조양호
인천 남구 용현3동 253 인하대학교

(72) 발명자 소재성
서울특별시서초구 반포동 반포아파트 16동 103호
류재승
경기도 안양시 동안구 호계3동 970-23 세종빌라 302호

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 길이다형성 DNA 염기서열을 이용한 다중 증폭증합효소연쇄반응 조건의 최적화에 의한 개인식별 및 친자감별 방법

요약:

본 발명은 길이다형성 DNA 염기서열을 이용한 다중증폭 PCR 조건의 최적화에 의한 개인식별 및 친자감별 방법에 관한 것으로서, 구체적으로 여러 부위의 길이다형성 (length -polymorphism) 유전자를 동시에 증폭할 수 있는 다중증폭 PCR의 최적화 조건을 구하고 이를 이용하여 다양증폭된 각 개인의 밴드 (band) 형태를 겔상에서 분석하는 개인식별 및 친자감별 방법에 관한 것이다. 본 발명의 개인식별 및 친자감별 방법은 종래의 길이다형성 DNA 염기서열을 이용하는데 있어서 상기 염기서열의 유전자좌를 각각 개별적인 PCR에 의해 증폭시켜 분석한 방법과 달리 여러 유전자좌를 동시에 PCR하여 특이적으로 증폭시킬 수 있는 조건을 최적화함으로써, DNA 염기서열을 이용한 개인식별과 친자감별을 수행하는데 소요되는 비용과 시간을 절약할 수 있다.

대표도
도 7b

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 VNTR(variable number of tandem repeat)과 STR(short tandem repeat)에 대한 개념을 나타내고,

도 2는 한국인 개체군에서 YNZ22의 대립유전자(allele) 프로필을 나타내는 1.5% 아가로즈겔 전기영동 사진이고,

레인 1 ; 1 kbp DNA 마커 레인 2 ; 6 -6 레인 3 ; 1 -7

레인 4 ; 7 -7 레인 5 ; 4 -5 레인 6 ; 5 -5

레인 7 ; 6 -6 레인 8 ; 5 -8 레인 9 ; 1 -6

레인 10 ; 4 -4 레인 11 ; 2 -10 레인 12 ; 2 -3

레인 13 ; 5 -5 레인 14 ; 4 -5 레인 15 ; 5 -5

레인 16 ; 2 -15 레인 17 ; 4 -6 레인 18 ; 1 kbp DNA 마커

레인 19 ; 1 kbp DNA 마커 레인 20 ; 6 -11 레인 21 ; 4 -5

레인 22 ; 3 -4 레인 23 ; 4 -4 레인 24 ; 검출되지 않음

레인 25 ; 6 -8 레인 26 ; 1 -1 레인 27 ; 검출되지 않음

레인 28 ; 4 -5 레인 29 ; 4 -8 레인 30 ; 5 -11

레인 31 ; 4 -4 레인 32 ; 4 -5 레인 33 ; 5 -6

레인 34 ; 검출되지 않음 레인 35 ; 1 -1 레인 36 ; 1 kbp DNA 크기 마커

도 3a는 한국인 개체군에서 뉴로텐신(neurotensin) 수용체 유전자의 대립유전자 프로필을 나타내는 은 연색한 PAGE 사진이고,

레인 1 ; 65 -70 레인 2 ; 73 -75 레인 3 ; 61 -74

레인 4 ; 70 -75 레인 5 ; 70 -74 레인 6 ; 60 -76

레인 7 ; 66 -70 레인 8 ; 65 -69 레인 9 ; 64 -75

레인 10 ; 64 -75 레인 11 ; 64 -68 레인 12 ; 66 -69

레인 13 ; 64 -75 레인 14 ; 68 -76 레인 15 ; 66 -76

레인 16 ; 68 -70 레인 17 ; 70 -75 레인 18 ; 69 -69

레인 19 ; 71 -73 레인 20 ; 69 -72 레인 21 ; 75 -75

레인 22 ; 63 -69 레인 23 ; 72 -72 레인 24 ; 검출되지 않음

레인 25 ; 72 -74 레인 26 ; 66 -74 레인 27 ; 72 -75

레인 28 ; 66 -76 레인 29 ; 75 -77 레인 30 ; 66 -72

레인 31 ; 64 -73 레인 32 ; 검출되지 않음 레인 33 ; 66 -78

레인 34 ; 72 -74 레인 35 ; 75 -75 레인 36 ; 65 -71

레인 37 ; 64 -78 레인 38 ; 70 -70 레인 39 ; 73 -78

레인 40 ; 71 -72 L ; 20 bp DNA 크기 마커

도 3b는 한국인 개체군에서 D21S11의 대립유전자 프로필을 나타내는 은 염색한 PAGE 사진이고,

레인 1 ; 33 -33 레인 2 ; 30 -31 레인 3 ; 31 -31

레인 4 ; 32 -32 레인 5 ; 31 -32 레인 6 ; 31 -31

레인 7 ; 31 -33 레인 8 ; 30 -32 레인 9 ; 32 -32

레인 10 ; 32 -34 레인 11 ; 33 -34 레인 12 ; 32 -33

레인 13 ; 32 -32 레인 14 ; 32 -34 레인 15 ; 33 -34

레인 16 ; 31 -34 레인 17 ; 32 -32 레인 18 ; 32 -34

레인 19 ; 32 -34 레인 20 ; 32 -33 레인 21 ; 31 -31

레인 22 ; 30 -31 레인 23 ; 29 -33 레인 24 ; 29 -31

레인 25 ; 30 -32 레인 26 ; 31 -34 레인 27 ; 31 -34

레인 28 ; 31 -35 레인 29 ; 31 -34 레인 30 ; 31 -34

레인 31 ; 31 -35 레인 32 ; 31 -32 레인 33 ; 31 -34

레인 34 ; 31 -34 레인 35 ; 31 -35 레인 36 ; 32 -34

레인 37 ; 30 -31 레인 38 ; 31 -34 레인 39 ; 31 -34

레인 40 ; 29 -34 L ; 20 bp DNA 크기 마커

도 3c는 한국인 개체군에서 인간 티로신 하이드록실라제(human tyrosine hydroxylase) 유전자의 대립유전자 프로필을 나타내는 은 염색한 PAGE 사진이고,

레인 1 ; 6 -7 레인 2 ; 7 -9 레인 3 ; 9 -9

레인 4 ; 6 -9 레인 5 ; 7 -9 레인 6 ; 7 -9

레인 7 ; 6 -9 레인 8 ; 6 -9 레인 9 ; 9 -10

레인 10 ; 9 -10 레인 11 ; 9 -10 레인 12 ; 7 -9

레인 13 ; 6 -7 레인 14 ; 6 -9 레인 15 ; 6 -6

레인 16 ; 7 -7 레인 17 ; 6 -9 레인 18 ; 9 -9

레인 19 ; 7 -7 레인 20 ; 6 -9 레인 21 ; 5 -5

레인 22 ; 8 -8 레인 23 ; 5 -8 레인 24 ; 6 -7

레인 25 ; 8 -8 레인 26 ; 6 -8 레인 27 ; 8 -8

레인 28 ; 5 -7 레인 29 ; 5 -8 레인 30 ; 5 -8

레인 31 ; 5 -8 레인 32 ; 8 -9 레인 33 ; 5 -8

레인 34 ; 5 -8 레인 35 ; 6 -8 레인 36 ; 8 -8

레인 37 ; 6 -8 레인 38 ; 6 -8 레인 39 ; 8 -8

레인 40 ; 6 -8 L ; 20 bp DNA 크기 마커

도 4a는 한국인 개체군에서 YNA22의 대립유전자 분포를 나타내는 그래프이고,

x : 대립유전자 y : 관찰된 대립유전자의 수

도 4b는 한국인 개체군에서 뉴로텐신 수용체 유전자의 대립유전자 분포를 나타내는 그래프이고,

x : 대립유전자 y : 관찰된 대립유전자의 수

도 4c는 한국인 개체군에서 D21S11의 대립유전자 분포를 나타내는 그래프이고,

x : 대립유전자 y : 관찰된 대립유전자의 수

도 4d는 한국인 개체군에서 인간 티로신 하이드록실라제 유전자의 대립유전자(allele) 분포를 나타내는 그래프이고,

x : 대립유전자 y : 관찰된 대립유전자의 수

도 5는 표준조건 하에서 수행한 다중증폭 PCR의 결과를 보여주는 아가로즈 겔 전기영동 사진이고,

M ; 크기 마커

레인 1 내지 5 ; 5명의 연관되지 않은 한국인 개체군에서의 검체

도 6a는 DNA 중합효소의 농도가 본 발명의 다중증폭 PCR에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이고,

레인 1 ; 크기 마커 레인 2 ; 0.5 U 레인 3 ; 1 U

레인 4 ; 1.5 U 레인 5 ; 2 U 레인 6 ; 2.5 U

레인 7 ; 3 U 레인 8 ; 4 U 레인 9 ; 5 U

도 6b는 MgCl₂의 농도가 본 발명의 다중증폭 PCR에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이고,

레인 1 ; 크기 마커 레인 2 ; 0.5 μ M 레인 3 ; 1 μ M

레인 4 ; 1.5 μ M 레인 5 ; 2 μ M 레인 6 ; 2.5 μ M

레인 7 ; 3 μ M 레인 8 ; 4 μ M 레인 9 ; 5 μ M

도 6c는 dNTP의 농도가 본 발명의 다중증폭 PCR에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이고,

레인 1 ; 크기 마커 레인 2 ; 50 μ M 레인 3 ; 100 μ M

레인 4 ; 200 μ M 레인 5 ; 400 μ M 레인 6 ; 600 μ M

레인 7 ; 800 μ M

도 6d는 프라이머의 부착 온도가 본 발명의 다중증폭 PCR에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이고,

도 6e는 중폭 순환 횟수가 본 발명의 다중증폭 PCR에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이고,

도 7a는 한 가계에서 친자관계를 확인하기 위하여 본 발명의 다중증폭 PCR에 의한 YNZ22 대립유전자의 프로필을 나타내는 1.5% 아가로즈 겔 전기영동 사진이고,

도 7b는 한 가계에서 친자관계를 확인하기 위하여 본 발명에서 3개 STR 부위의 다중증폭 PCR 결과를 8% 고해상도 PAGE로 은 염색한 전기영동 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 길이다형성 DNA 염기서열을 이용한 다중증폭 PCR 조건의 최적화에 의한 개인식별 및 친자감별 방법에 관한 것으로서, 구체적으로 여러 부위의 길이다형성 유전자를 동시에 증폭할 수 있는 다중증폭 PCR의 최적화 조건을 구하고 이를 이용하여 다양증폭된 각 개인의 밴드 형태를 겔상에서 분석하는 개인식별 및 친자감별 방법에 관한 것이다.

최근 분자생물학의 발전으로 인간 개개인의 유전자 구조는 일관성 쌍생아를 제외한 모든 사람에서 특이성을 갖는다는 것이 밝혀졌다. 약 30억 염기쌍(base pair)에 달하는 인체의 유전자 중 인체의 기능에 중요하게 관여하는 부위는 거의 모든 사람이 동일한 구조를 가지고 있다. 그러나, 중요한 기능과 직접적으로 관련이 없는 약 10% 미만의 염색체 부위는 사람마다 차이를 나타낸다. 염색체 상의 차이를 밝히는 분자생물학적인 기법으로는 제한효소의 인식부위의 차이를 밝히는 방법(restriction fragment length polymorphism, RFLP)과 DNA 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 "PCR" 이라 약칭함)을 이용한 VNTR(variable number of tandem repeat) 또는 STR(short tandem repeat)의 감식 방법이 주로 사용되고 있다.

사람의 유전자 중에는 각각의 개체에 따라 그 염기서열 구조가 매우 다른 부위가 존재한다. 이를 과변이영역(hypervariable region)이라 부르는데, 이러한 과변이영역의 많은 부위는 단순한 염기서열이 반복적으로 존재하는 경우가 많다.

직렬로 (tandemly) 반복되는 DNA 서열은 인간 게놈에 매우 광범위하게 존재하며, 개인마다 그 유형이 충분히 다양하기 때문에 유전자 지도 (genetic mapping), 연관 분석 (linkage analysis) 그리고 개인식별 검사 등의 분야에서 광범위하게 적용되고 있다. 이러한 DNA 상의 직렬 반복 부위는 반복되는 중심의 크기에 따라서 전형적으로 몇 개의 그룹으로 분류되는데, VNTR이라고 불리는 미니부수체 (minisatellite)는 중심에 9 내지 80 bp의 반복서열을 가지는 반면에 STR이라고 불리는 마이크로부수체 (microsatellite)는 2 내지 5 bp의 반복서열을 가지며 (도 1참조) 모두 멘델의 유전법칙에 따라 부모에서 자손으로 유전된다. STR은 사람의 유전정보를 수록하고 있는 인류의 게놈 (genome)에 수십만 개가 고르게 분포되어 있으며 100 내지 400 bp의 작은 크기를 가지고 있기 때문에 PCR을 이용하여 미량의 게놈 DNA로부터 대량 증폭이 용이하여 개인을 식별하기 위한 수단으로서 뿐만 아니라 법의학 (forensic science), 진화 및 인류학 분야에서 광범위하게 이용되고 있다. 게놈 내의 일반적인 유전자는 변이가 적어 대립형의 수가 몇 개 이하로 한정되어 있으나, STR은 염기서열이 반복되는 횟수가 개인마다 다르고 게놈 내에서 가장 변이가 심한 영역이기 때문에 대립형의 수가 적게는 몇 개에서 많게는 수백 개까지 존재하는 것으로 알려져 있다. 반복되는 특정 염기서열의 반복 횟수가 사람에 따라서 차이가 많고 그 분포가 전체 인구에 골고루 분포할 때 더욱 중요한 가치를 가지는 STR 마커가 된다. 이러한 STR의 과다한 변이로 인하여 개개인이 가지고 있는 유전자 대립형들이 서로 다르기 때문에 여러 가지 STR 대립형들로 구성되는 DNA 프로필 (profile)은 개인마다 고유하다고 할 수 있다.

친자확인이나 법의학 분야에서 사용되는 개인식별 검사는 개인간의 유전적인 차이점을 발견하는데 그 목적이 있다. 전형적으로 대부분의 경우에 네 개의 염기서열이 반복되는 부위가 개인식별에 선택되어 사용되어 왔는데 그 이유는 인간 접두에서 다형성의 정도가 가장 크기 때문이다 (Gao Q. et al., Electrophoresis, 20, 1518 -1526, 1999). 유전자 내에 존재하는 수많은 VNTR이나 STR 부위의 유전자형 (genotyping)을 확인하기 위하여 여러 가지 방법이 사용될 수 있는데, 그 중의 하나가 PCR을 이용하는 방법으로 형광물질로 표지된 프라이머를 이용하여 마커 부위의 염기서열을 PCR로 증폭한 후, 결과물을 전기영동으로 분석하는 것이다. 전기영동은 특정 마커의 크기를 정확하게 판별해주며, 그 크기를 기초로 마커 내에 단순 반복이 몇 회 존재하는지를 확인할 수 있다. 인체에는 동일한 염색체가 한 쌍으로 존재하므로 크기가 다른 특정 마커가 2개 존재할 수 있다. 여러 부위의 마커에 대한 정보를 검색하여 마커 각각의 정보를 개개인에 따라 종합적으로 분석할 수 있는데, 이를 DNA 타이핑 (typing)이라 하며 여러 종류의 마커를 이용한 DNA 타이핑의 결과는 각 개인마다 특수한 조합을 형성한다.

상기의 PCR에 기초한 타이핑 기법은 빠른 속도로 일반화되었는데, 그 이유는 시간이 적게들고 쉽게 해석이 가능한 결과물을 생산하여 개인식별이나 혈연의 결정을 가능하게 하기 때문이다 (Chakraborty R. et al., Electrophoresis, 20, 1682 -1696, 1999). PCR 생성물의 분리는 대부분 슬랩 (slab) 갤 전기영동을 통해 이루어졌는데, 상기에서 PCR 생성물의 크기는 동일한 레인 (lane) 혹은 인접한 레인의 기준 크기 마커 (standard size marker)가 이동한 거리와 비교함으로써 확인될 수 있고 상기 과정을 통해서 VNTR이나 STR의 대립유전자들을 구별할 수 있다. 또한, DNA의 검출을 위해서 값이 저렴한 은 염색을 합으로써 영구적인 전기영동 유형의 결과를 획득할 수 있다. PAGE와 은 염색을 조합한 상기 방법은 서던 블롯 (Southern blot)에 의한 VNTR이나 STR 부위의 RFLP 분석에 비해서 구별된 대립유전자 해상도 (discrete allele resolution)와 단일밴드 VNTR 및 STR 유형의 정확한 유전자형을 얻을 수 있고 동위원소를 사용하지 않으며 (nonisotopic assay) 분석시간이 짧은 등의 몇 가지 장점을 가지고 있다. 하지만, 하나의 길이다형성 부위를 분석하는 것만으로는 인간 개인식별을 정확하게 하는 것이 불가능하다. 조사에 사용되는 길이다형성 부위의 수가 증가할수록 두명의 연관되지 않은 다른 개체에서 동일한 대립유전자가 검출될 가능성은 감소하므로, 반일 여려 개의 길이다형성 부위가 사용된다면 훨씬 더 명백하게 개인식별이 가능할 것이다.

종래에는 개인식별과 친자감별을 수행하기 위해서 여러 개의 길이다형성 DNA 염기서열 부위를 개별적으로 PCR을 수행하여 분석하였는데, 상기 방법은 개인식별을 하는데 있어서 많은 비용과 시간이 든다는 단점이 있었다.

이에, 본 발명자들은 다중증폭 PCR을 이용하여 동시에 여러 개의 길이다형성 DNA 염기서열 부위를 한번의 반응으로 대립유전자 크기의 겹침 (overlapping)이 없이 증폭할 수 있는 적정조건을 최적화함으로써 개인식별 및 친자감별에 필요한 많은 비용과 시간 및 인력을 줄일 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 여러 개의 길이다형성 DNA 염기서열 부위를 동시에 증폭시켜 분석할 수 있는 최적의 다중증폭 PCR 조건을 제공함으로써 개인식별 및 친자감별을 수행하는데 소요되는 비용과 시간을 절약하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 여러 개의 길이다형성 유전자좌를 동시에 증폭시킬 수 있는 다중 증폭 PCR을 이용한 개인식별 및 친자감별 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 다중 증폭 PCR을 이용한 개인식별 및 친자감별 방법에 있어서 최적의 반응조건을 제공한다.

아울러, 본 발명은 상기 방법을 이용하여 개인식별 및 친자감별을 용이하게 구현할 수 있는 DNA 타이핑 키트를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 여러 개의 길이다형성 유전자좌를 동시에 증폭시킬 수 있는 다중 증폭 PCR을 이용한 개인식별 및 친자감별 방법을 제공한다.

상기 개인식별 및 친자감별 방법은

- 1) 피검자의 DNA를 추출하는 단계;
- 2) 상기 DNA를 주형으로 길이다형성 유전자에 대한 다중 증폭 PCR을 수행하는 단계; 및
- 3) 증폭된 DNA의 물리화학적 특성을 측정하는 단계로 구성된다.

상기 단계 2에서 본 발명의 길이다형성 유전자는 염색체 상의 이형접합 비율이 높고 대립형의 수가 많으며 고르게 분포해 있어야 하고 하기수학식 1에 의해 계산되는 다형성 정보 용량 (polymorphism information content, 이하 "PIC"라 약칭함) 값이 1에 가까울 때 가장 바람직하다.

< 수학식 1 >

$$1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 2p_j^2$$

여기에서, n 은 대립유전자의 수를 나타내고 p_i 는 각 대립유전자좌의 대립형질 빈도 (allelic frequency)를 나타낸다.

상기 단계 3은 추출된 DNA의 물리화학적 특성을 측정하는 단계로서, PCR에 의해 증폭된 DNA 절편의 길이를 측정하는 검사, 보합 (hybridization)을 측정하는 검사, 전기영동성 (electrophoretic mobility)을 측정하는 검사 등 염기서열의 특성으로 인한 다양한 물리화학적 특성을 측정하는 검사를 수행할 수도 있고, 직접 염기서열을 결정하는 검사를 수행할 수도 있다. 상기 보합을 측정하는 검사의 범주에는 통상의 서던 블렛 (Southern blot) 분석, 노던 블렛 (Northern blot) 분석 등 뿐만 아니라 DNA 침 등을 이용하여 자동화된 분석 방법이 포함된다. 또한, 상기 전기영동성을 측정하는 검사의 예로는 젤 감속 분석 (gel retardation assay) 등이 있다. 상기 단계 3에서 DNA의 물리화학적 특성을 측정하기 위해서, 검사 대상이 되는 유전자 또는 그와 보합하는 염기서열을 통상의 방법대로 표지하여 정량 또는 정성 분석 한다. 이때 바람직한 탐지 방법으로는 자기방사선화방법 (autoradiography), 형광표지법 (fluorescence labeling), 은 염색법 (silver staining) 등이 있으며, 상기 길이다형성 유전자들의 다른 타입들은 증폭된 절편의 크기로 판별할 수 있다.

본 발명의 길이다형성 유전자좌를 이용한 다중증폭 PCR이 개인식별 및 친자감별에 유용하게 사용될 수 있는지 확인하기 위하여, 본 발명자들은 한 가계에서 한곳의 VNTR 유전자좌와 3곳의 STR 유전자좌를 다중증폭 PCR을 사용하여 증폭시켜 친자검사를 수행하였다. 본 발명자들은 VNTR 부위로는 서열번호 1로 기재되는 YNZ22 유전자의 길이다형성 부위를 선택하였고 STR 부위로는 서열번호 2로 기재되는 뉴로텐신 수용체 유전자(NeuR, 340 -430 bp), 서열번호 3으로 기재되는 D21S11(200 -240 bp) 그리고 서열번호 4로 기재되는 인간 티로신 하이드록실라제(Humth01, 140 -165 bp) 유전자의 길이다형성 부위를 선택하였다. YNZ22 부위는 반복되는 중심(core)의 크기가 70 bp로 상대적으로 크기 때문에 전기영동에서 유전자형을 판별하기가 쉽다는 장점이 있다.

양친과 두명의 딸 그리고 한명의 아들에게서 서열번호 1내지 서열번호 4로 기재되는 길이다형성 유전자좌를 본 발명의 최적화된 다중 증폭 PCR을 이용하여 친자감별을 수행한 결과, 부모의 일부의 대립유전자의 조합에 의해서 자손들의 유전자가 형성됨을 확인하였고 따라서 본 발명의 길이다형성 DNA 염기서열을 이용한 다중증폭 PCR이 개인식별이나 친자감별에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다(도 7a 및 도 7b 참조).

또한, 본 발명은 상기 다중 증폭 PCR을 이용한 개인식별 및 친자감별 방법에 있어서 최적의 반응조건을 제공한다.

본 발명의 다중 증폭 PCR 방법은 증폭 매개변수들(parameters)의 다양성(variation)이 PCR의 효율(efficacy)과 신뢰성(reliability)에 미치는 영향에 대해서 기술한다. 본 발명의 다중 증폭 PCR의 최적의 반응조건을 확립하기 위하여, 먼저 본 발명자들은 서열번호 1로 기재되는 하나의 VNTR 유전자좌와 서열번호 2내지 서열번호 4로 기재되는 3개의 STR 유전자좌를 길이다형성 유전자로 선별하여 한국인 개체군에서의 상기 부위의 유전자형을 확인하였다. 상기 길이다형성 부위의 유전자를 선별함에 있어서 우선적으로 고려되어야 할 사항은 각 부위의 PCR 생성물들의 크기가 전기영동을 하였을 때 서로 구분이 될 수 있을 만큼 충분히 차이가 나야 한다는 점이다.

먼저 면봉을 이용하여 얻은 구강(buccal) 검체와 머리카락 검체를 연관되지 않은(unrelated) 한국인으로부터 각각 2배수로 수집하고 퀼레이팅 수지법(chelating resin method)을 사용하여 검체의 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 서열번호 1내지 서열번호 4로 기재되는 각각의 VNTR과 STR 유전자좌에 특이적인 서열번호 5내지 서열번호 12로 기재되는 프라이머를 사용하여 표준 조건 하에서 PCR로 증폭하였다. 상기 PCR 결과물을 전기영동을 사용하여 분리하고 염색을 실시하였다.

그 결과, 각각의 대립유전자는 VNTR과 STR 유전자좌의 반복되는 단위가 증가할수록 완전하게 구분되었으며(resolved), 따라서 상기의 4개 길이다형성 부위가 본 발명에 기술된 방법을 이용하여 성공적으로 분석될 수 있음을 확인하였다(도 2, 도 3, 표 2a 및 표 2b 참조).

이전 기술에서, PCR 생성물의 증폭이나 수율의 효율은 프라이머 사이의 표적부위(target site)의 크기와 관련이 있다고 알려져 있었다(Horn GT. et al., Nucleic Acids Research, 17, 2140, 1989). 예를 들면, D17S30 부위에서 긴 대립유전자는 짧은 대립유전자보다 의미있게 작은 정도로만 증폭이 되었다. 그렇지만, 본 발명에서는 가장 긴(15열) 대립유전자와 가장 짧은(1열) 대립유전자 밴드의 농도(intensity)는 거의 차이가 없었다(도 2 참조). 따라서, YNZ22 PCR 생성물의 크기 분석을 통해서 VNTR 프로필의 정확한 유전자형을 확인할 수 있었다. 상기의 결과는 서던 블롯(Southern blot)에 의한 RFLP 분석과 대조되는데, 여기에서는 정확한 유전자형의 분석은 거의 불가능하다. 이전 기술에서, 길이가 긴 DNA 단편들은 짧은 단편보다 증폭하기가 더 어려웠다(Thomas, E. Herrera RJ., Electrophoresis, 19, 2373 -2379, 1988). 이러한 밴드의 겹침을 증가시키기 위하여, 본 발명자들은 증폭이 잘 안되는 부위에서의 프라이머 양을 증가시켰고 또한 신장(extension) 시간을 증가시켰다. 상기의 변화들을 통해서 길이가 긴 단편들의 증폭을 증가시킬 수 있었다.

본 발명의 4개의 길이다형성 부위의 대립유전자(allele) 분포를 살펴보면, YNZ22의 경우에는 15개의 다른 대립유전자가 관찰되었다. 뉴로덴신 수용체 유전자의 경우에는 22개의 다른 대립유전자가 관찰되었으며, D21S11의 경우에는 9개의 다른 대립유전자가 관찰되었다. 인간 티로신 하이드록실라제 유전자의 경우에는 여섯 개의 다른 대립유전자가 관찰되었다. PIC 값에 기초하여 VNTR과 STR 부위의 대립형질 빈도(allelic frequency)를 확인한 결과, 한국인 개체군에서 가장 빈번하게 나타나는 대립유전자는 YNZ22의 대립유전자 1($f=0.22727$), NeuR의 대립유전자 66($f=0.11111$), D21S11의 대립유전자 31($f=0.30208$) 그리고 Humth01의 대립유전자 9($f=0.21023$)이었다. 본 발명자들이 조사한 4개의 길이다형성 유전자좌는 모두 한국인 개체군에서 대립형질 빈도가 높음을 확인하였다(PIC > 0.5). 조사한 4개의 부위 중 가장 높은 PIC 값을 보이는 유전자좌는 NeuR(0.95680)이었으며, 가장 낮은 값을 보이는 유전자좌는 Humth01이었다(0.75809)(도 4a내지도 4d및 표 3참조).

다음으로, 최적의 다중 증폭 PCR 조건을 확립하기 위하여 본 발명자들은 서열번호 2 내지 서열번호 4로 기재되는 3가지 STR 유전자좌에서 DNA 중합효소의 농도, 마그네슘 이온의 농도, dNTP의 농도, 프라이머의 부착온도 및 증폭횟수의 5가지 요소가 다중 증폭 PCR에 미치는 영향을 확인하였다.

그 결과, DNA 중합효소의 농도는 2 내지 2.5 U일 때 최적이었으며 더 높은 농도(3 내지 5 U)일 때는 다른 부위에 비해서 상대적으로 NeuR 생성물의 양이 증가하였고, 효소의 농도가 높아질수록 NeuR 유전자좌의 스타터(stutter) 밴드 출현빈도가 증가하였다(도 6a참조).

마그네슘 이온의 농도는 프라이머 어닐링, 주형과 PCR 생성물에서 스트랜드(strand) 해리온도(dissociation temperature), 생성물의 특이성(product specificity), 프라이머 -다이머 인공물(primer-dimer artifact)의 생성 및 효소의 활성과 정확성(fidelity) 등의 모든 과정에 영향을 미쳤다(Innis MA. et al., PCR protocols, Academic press, part one, 3 -12, 1989). 마그네슘 이온의 농도가 0.5 mM로 떨어지면 3 부위 STR 유전자좌의 증폭 효율이 모두 상당히 감소하였다. 1.5 내지 2.5 mM의 농도에서는 NeuR과 D21S11 부위에서는 어떤 증폭 밴드도 나타나지 않은 반면, 5 mM의 농도에서는 Humth01 부위가 증폭되지 않았다(도 6b참조).

dNTP는 이전 기술에서는 100 μ M의 농도에서 얻어진 밴드 유형이 가장 뚜렷하고(distinct) 깨끗한(clean) 프로필을 보였지만(Song JE. et al., Foods and Biotechnology, 6, 30 -33, 1997), 본 발명의 다중 증폭 PCR에서는 200 내지 400 μ M의 dNTP 농도에서 최적을 나타내었다. 50 μ M의 농도에서는 단지 Humth01 밴드만이 매우 약하게 관찰되고 800 μ M의 농도에서는 강한 Humth01 밴드가 관찰되었다. 600 μ M 농도에서는 D21S11 밴드가 관찰되지 않음을 알 수 있었다(도 6c참조).

프라이머 부착 온도는 다중 증폭 PCR에서 가장 중요한 변수(parameter)이며 낮은 어닐링 온도는 원하는 생성물의 수율(yield)을 감소시키며 비특이적(nonspecific) 증폭을 증가시킨다고 알려져 있었는데(Wittwer CT, Garling DJ, Biotechniques, 10, 76 -80, 1991), 본 발명자들 또한 유사한 결과를 얻었다. 모든 STR 부위가 62°C와 63°C의 프라이머 부착 온도에서 효과적으로 증폭되었으며, 62°C보다 낮은 온도에서는 NeuR 유전자좌 근처에서 인공물 밴드가 관찰되었다. 64°C에서는 Humth01 유전자좌에서 증폭 밴드가 거의 관찰되지 않았고, 65°C에서는 D21S11 유전자좌에서 관찰되지 않았다(도 6d참조).

또한, 본 발명자들은 15 내지 40회에서의 증폭주기의 변화효과를 관찰하였다. 그 결과, 전체 생성물의 수율은 증폭주기와 직접적인 비례관계에 있었다. 30회의 증폭주기에서는 모든 STR 유전자좌가 증폭된 반면에 35회 이상에서는 단지 NeuR 유전자좌에서만 부가적인 증폭이 관찰되었다(도 6e참조).

상기의 결과로부터, 3곳의 STR을 모두 증폭시킬 수 있는 본 발명의 3중 증폭 PCR 반응의 최적 반응조건은 2.0 U의 DNA 중합효소, 3 mM의 MgCl₂, 200 μ M의 dNTP 및 10 pmole의 각각의 프라이머 세트를 포함하는 전체부피 25 μ l의 반응용액에서 62°C의 프라이머 부착 온도로 35회 증폭하는 것임을 확인하였다.

아울러, 본 발명은 상기 방법을 이용하여 개인식별 및 친자감별을 용이하게 구현할 수 있는 DNA 타이핑 키트를 제공한다.

본 발명의 DNA 타이핑 키트는 DNA 타이핑 막 또는 칩을 포함하며, STR 분석을 통한 개인 식별을 위해 생물학적 마이크로 칩 등을 이용한 자동화된 분석 방법을 이용할 수 있다. 그 외에 STR 중복시 융합된 디옥시제닌과 같은 항체에 대한 항원 단백질, 적당한 완충용액, 표준항체, 발색효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색기질, DNA 제한효소 등을 포함할 수 있다. 이 때, 발색효소는 퍼옥시데이즈 (peroxidase), 알칼라인 포스파테이즈 (alkaline phosphatase) 또는 갈락노시데이즈 (galactosidase) 등이 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, TRITC 또는 [F-18]-FDG 등이 사용될 수 있으며, 발색제는 4CN(4-chloro-1-naphthol), DAB(diaminobenzidine), AEC(aminoethyl carbazole), ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], OPD(o-phenylenediamine) 또는 TMB(tetra methyl benzidine) 등이 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 1 > 길이다형성 부위에서의 유전자형의 확인

본 발명의 서열번호 1로 기재되는 VNTR 유전자와 서열번호 2내지서열번호 4로 기재되는 STR 부위의 유전자형을 한국인 개체군에서 확인하기 위하여, 본 발명자들은 표준 증폭 조건 (standard amplification condition)에서의 PCR을 수행하였다.

< 1 -1 > 검체와 DNA 추출

면봉을 이용하여 60개의 구강 (buccal) 검체와 40개의 머리카락 검체를 연관되지 않은 (unrelated) 한국인으로부터 수집하였다. 검체는 각 개인으로부터 2배수로 수집하였으며 칠레이팅 수지법 (chelating resin method)을 사용하여 검체의 DNA를 추출하였다. DNA를 추출하기 위하여, 먼저 구강 상피세포 또는 모근을 5% 칠렉스 레진 (Chelex resin) 2.00 μl와 단백질 분해효소 K (proteinase K)가 포함된 용액에 넣고 볼테싱 (vortexing) 한 후 57°C에서 7시간 배양하고 다시 10분간 끓임으로써 세포파괴와 동시에 DNA는 물총에 녹게되며 기타 효소 및 세포파쇄물들은 칠렉스 레진에 흡착이된다. 상기 용액을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리를 실시하고 상층액 5 μl를 취하여 PCR을 실시하였다.

< 1 -2 > 표준조건에서의 DNA 증폭 및 진기영동 분석

YNZ22, NeuR, D21S11 및 Humth01 부위는 하기표 1에 기술한 각각에 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 증폭되었다.

[표 1]

본 발명에서 사용한 길이다형성 유전자의 프라이머 서열

표적 유전자	프라이머 서열	반복되는 중⼼크기	생성물의 크기
YNZ22 서열번호 6	서열번호 5	70 bp	170 - 1000 bp
NeuR 서열번호 8	서열번호 7	4 bp	340 - 430 bp
D21S11 서열번호 10	서열번호 9	4 bp	200 - 240 bp
Humth01 서열번호 12	서열번호 11	4 bp	140 - 165 bp

표준 조건에서 YNZ22 유전자좌의 PCR은 $1.5 \mu\text{l}$ 의 Taq DNA 중합효소, $200 \mu\text{M}$ 의 dNTP(UTP), 10 pmole 의 각각의 프라이머, $2.5 \mu\text{l}$ 의 $10\times$ PCR 반응 완충용액 및 $5 \mu\text{l}$ 의 주형(template) DNA로 구성된 $25 \mu\text{l}$ 부피의 반응 혼합물을 테크네 PCR 시스템(Techne PCR system, Perkin Elmer, USA)의 PE2400을 사용하여 수행하였다. 50°C 에서 5분간, 95°C 에서 5분간 UMG[우라실(urasil) DNA 글라이코실라제(glycosylase)] 반응으로 초기 변성(initial denaturation)을 시킨 후 94°C 에서 35초간, 62°C 에서 35초간, 72°C 에서 35초간 35회 반복 시행하고 최종 연장(final extension)은 72°C 에서 5분간 수행하였다.

표준 조건에서 본 발명의 서열번호 2내지서열번호 4로 기재되는 NeuR, D21S11 및 Humth01 유전자좌의 PCR은 3U의 Taq DNA 중합효소, $400 \mu\text{M}$ 의 dNTP, 10 pmole 의 각각의 프라이머, $2.5 \mu\text{l}$ 의 $10\times$ PCR 반응 완충용액 및 $5 \mu\text{l}$ 의 주형(template) DNA로 구성된 $25 \mu\text{l}$ 부피의 반응 혼합물을 테크네 PCR 시스템(Techne PCR system)을 사용하여 수행하였다. 증폭 온도는 95°C 에서 5분간 초기 변성(initial denaturation)을 시킨 후 95°C 에서 35초간, 62°C 에서 35초간, 72°C 에서 1분간 35회 반복 시행하고 최종 연장(final extension)은 72°C 에서 5분간 수행하였다.

YNZ22 PCR 생성물은 1.5% 아가로즈 겔 전기영동을 사용하여 분리하였다. NeuR, D21S11 및 Humth01 부위로부터 증폭된 PCR 생성물은 5% 내지 8%의 고해상도 PAGE를 사용하여 분리하였고 이후에 은 염색을 실시하였다. 은 염색은 먼저 10% 아세트산(고정용액) 속에 20분간 겔을 치지한 후 증류수로 2분간 3차례 겔을 세척하였다. 0.1% 질산은과 5.5% 포르말린 용액에 30분 동안 겔을 침지시킨 후 염색용액을 제거하고 15초 동안 증류수로 겔을 세척하였다. 이미지의 강도에 따라 30% Na₂CO₃와 5.5% 포르말린 용액(현상액)에 겔을 황원시킨 후 10% 아세트산(정지용액)으로 2분동안 처리하여 환원 과정을 중지하였다. 이 후에 영구적인 기록을 위해서 공기 중에서 겔을 건조시켰으며 그 결과를 도 2와도 3에 나타내었다.

< 1 -3 > 한국인 개체군에서 4개의 길이다형성 유전자좌의 유전자형

도 2와도 3의 결과로부터, 각각의 대립유전자들은 VNTR과 STR 부위의 반복되는 단위가 증가할수록 완전하게 구분되었으며(resolved) 따라서 본 발명의 4개의 길이다형성 부위가 본 발명에 기술된 방법을 이용하여 성공적으로 분석될 수 있음을 확인하였다.

도 2와도 3의 결과에서 확인된 한국인 개체군에서 관찰된 본 발명의 VNTR과 STR 부위의 유전자형(genotype)의 분포를 하기표 2a와표 2b에 요약하였다.

[표 2]

한국인 개체군에서 각 길이다형성 부위의 유전자형(genotype) 분포

유전자형 ^a	관찰되는 YNZ22 수	유전자형 ^b	관찰되는 NeuR 수 ^b			
1 -1...1 -2...1 -3...	11422122111112	55 -65...58 -66...5	11111121111122	67 -67...67 -70...6	412112212112112	
1 -4...1 -5...1 -6...	367111152113511	9 -60...60 -76...61	331312121114122	7 -74...67 -75...68	1212121121	
1 -7...2 -2...2 -3...	1113	-61...61 -68...61 -	231	-68...68 -70...68 -		
2 -4...2 -10...2 -1		74...62 -68...62 -7		73...68 -76...69 -6		
2...2 -15...3 -3...		3...63 -67...63 -69...		9...69 -71...69 -72...		
3 -4...4 -4...4 -5...		63 -75...64 -64...6		69 -73...70 -70...7		
4 -6...4 -8...4 -1		4 -68...64 -70...64		0 -74...70 -75...71		
1...4 -13...5 -5...		-73...64 -75...64 -		-72...71 -73...72 -		
5 -6...5 -8...5 -1		78...65 -65...65 -6		72...72 -74...72 -7		
0...5 -11...6 -6...		7...65 -69...65 -70...		5...73 -73...73 -75...		
6 -7...6 -8...6 -1		65 -71...66 -66...6		73 -78...75 -75...7		
0...6 -11...6 -12...		6 -67...66 -68...66		5 -77...		
7 -7...		-69...66 -70...66 -				
		72...66 -73...66 -7				
		4...66 -76...66 -78...				
33				58		

*: 반복되는 중심의 수에 근거한 유전자 구성

a : VNTR좌 b : STR좌(뉴로텐신 수용체 유전자)

[표 3]

한국인 개체군에서 각 길이다형성 부위의 유전자형(genotype) 분포

유전자형 ^c	관찰되는 D21S11 수 ^c	유전자형 ^d	관찰되는 Humth01 수 ^d
29 -31...29 -33...29 -34...29	111139312101031041125847	5 -5...5 -6...5 -7...5 -8...6	1111036121144159371
-30...30 -30...30 -31...30 -3	1222	-6...6 -7...6 -8...6 -9...7 -	
2...30 -33...30 -34...31 -31...		7...7 -9...8 -8...8 -9...9 -9....	
31 -32...31 -33...31 -34...31		9 -10...10 -10..	
-35...31 -36...32 -32...32 -3			
3...32 -34...32 -35...32 -37...			
33 -33...33 -34...33 -36...			
23		15	

*: 반복되는 중심의 수에 근거한 유전자 구성

c : STR좌 d : STR좌(인간 티로신 하이드록실라제)

< 1 -4 > 한국인 개체군에서 4개의 길이다형성 유전자좌의 대립형질 분포도

도 4는 한국인 개체군에서 본 발명의 4개의 길이다형성 부위의 대립유전자(allele) 분포를 보여준다. YNZ22의 경우, 15개의 다른 대립유전자가 77명의 연관되지 않은 한국인에게서 관찰되었다. 각각의 대립유전자를 1 -15(대립유전자 9와 14는 관찰되지 않았다)로 나타내었으며, 상기에서 대립유전자 1은 가장 짧은 길이를 나타내고 대립유전자 15는 가장 긴 길이를 나타낸다(도 4a). 뉴로텐신 수용체 유전자(NeuR)의 경우에는, 22개의 다른 대립유전자가 90명의 연관되지 않은 한국인 개체군에서 관찰되었다. 각각의 대립유전자는 55 -78로 나타내었으며(대립유전자 56과 57은 관찰되지 않았다), 상기에서 55는 가장 짧은 길이의 대립유전자를 나타내고 78은 가장 긴 길이의 대립유전자를 나타낸다(도 4b). D21S11의 경우에는, 96명의 연관되지 않은 한국인 개체군에서 9개의 다른 대립유전자가 관찰되었다. 각각의 대립유전자는 29 -37로 나타내었으며, 상기에서 29는 가장 짧은 길이의 대립유전자를 나타내고 37은 가장 긴 길이의 대립유전자를 나타낸다(도 5c). 인간 터로신 하이드록실라제 유전자(Humth01)의 경우에는, 여섯 개의 다른 대립유전자가 88명의 연관되지 않은 한국인 개체군에서 관찰되었다. 각각의 대립유전자는 5 -10으로 나타내었으며, 상기에서 대립유전자 5는 가장 짧은 길이를 나타내고 대립유전자 10은 가장 긴 길이의 대립유전자를 나타낸다(도 5d).

< 1 -5> 4개의 길이다형성 유전자좌의 대립형질 빈도 및 PIC 값 측정

PIC (polymorphism information content) 값은 하기의 수학식 1에 의해 계산되었다. 각각의 유전자좌는 많은 대립유전자(allele) 부위를 가지고 있고 PIC 값이 1에 가까울수록 더욱 바람직하며, 인간 개인식별에 유용하게 사용될 수 있다(Botstein D. et al., American Journal of Human Genetics, 32, 314 -331, 1980)

수학식 1

$$1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) \cdot \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

여기에서, n은 대립유전자의 수를 나타내고 P_i 는 각 대립유전자좌의 대립형질 빈도 (allelic frequency)를 나타낸다.

그 결과, 한국인 개체군에서 VNTR과 STR 부위의 대립유전자 분포에 기초한 대립형질 빈도 (allelic frequency)를 하기표 3에 나타내었다. 한국인 개체군에서, 가장 빈번하게 나타나는 대립유전자는 YNZ22의 대립유전자 1 ($f=0.22727$), NeuR의 대립유전자 66 ($f=0.11111$), D21S11의 대립유전자 31 ($f=0.30208$) 그리고 Humth01의 대립유전자 8 ($f=0.34659$)이었다. 본 발명자들이 조사한 4개의 길이다형성 유전자좌는 모두 한국인 개체군에서 대립형질 빈도가 높음을 확인하였다 (PIC > 0.5). 조사한 4개의 부위 중 가장 높은 PIC 값을 보이는 유전자좌는 NeuR (0.95680)이었으며, 가장 낮은 값을 보이는 유전자좌는 Humth01이었다 (0.75809). 상기 결과는 본 발명의 VNTR과 STR 부위 중 NeuR 부위가 한국인 개체군에서 유전자 감별에 가장 유용한 길이다형성 유전자좌라는 것을 뜻한다.

[표 4]

한국인 개체군에서 분석된 대립형질 빈도와 PIC 값

대립유전자	YNZ22*	대립유전자	NeuR*	대립유전자	D21S11*	대립유전자	Humth01*	
12345678910	0.227270.071	55565758596	0.005560.000	29303132333	0.020830.114	5678910	0.079550.204	
1112131415	430.064940.1	06162636465	000.000000.0	4353637	580.302080.2		540.107950.3	
	88310.16234	66676869707	05560.00556		86460.09375		46590.21023	
	0.129870.058	17273747576	0.011110.027		0.119790.041		0.05114	
	440.019480.0	7778	780.011110.0		670.015630.0			
	00000.01948		16670.07222		0521			
	0.032470.012		0.072220.111					
	990.006490.0		110.083330.0					
	00000.00649		66670.08333					
			0.066670.033					
			330.050000.1					
			00000.05000					
			0.077780.027					
			780.005560.0					
			1667					
PIC#	0.85112		0.95680		0.76885		0.75809	

* : 조사된 한국인 개체군에서 각 대립유전자의 빈도를 나타냄

: PIC 값은 수학식 1에 의해 계산함

< 실시예 2> 길이다형성 유전자좌를 이용한 다중증폭 PCR 조건의 최적화

< 2 -1 > 표준조건에서의 다중증폭 PCR

본 발명자들은서열번호 2내지서열번호 4로 기재되는 3개의 STR 유전자좌를 동시에 증폭할 수 있는 최적의 다중 증폭 PCR 조건을 확립하기 위하여, 먼저 5명의 연관되지 않은 한국인 개체군에서 표준 조건에서의 PCR을 수행하였다. 표준 조건에서의 다중 증폭 PCR은 3 U의 Taq DNA 중합효소(DMS, 한국), 400 μ M의 dNTP, 10 pmole의 서열번호 7내지서열번호 12로 기재되는 각각 STR 유전자좌에 대한 프라이머, 2.5 μ l의 10×PCR 반응 완충용액 및 상기 실시예 < 1 -1 >에서 추출한 주형 DNA 5 μ l로 구성되는 전체부피 25 μ l의 반응용액에서 수행되었다. PCR 증폭은 프로진(Pro gene) PCR 시스템(Techne, England)을 사용하여 수행되었으며, 95°C에서 5분간 반응으로 초기 변성을 시킨 후 94°C에서 35초간, 62°C에서 1분간, 72°C에서 1분간 35회 반복 시행하고 최종 연장은 72°C에서 5분간 수행하였다.

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 표준조건 하에서는 본 발명의서열번호 2내지서열번호 4로 기재되는 3개의 길이다형성 STR 유전자좌가 모두 증폭되었으나 비특이적인 밴드들이 많이 확인되어 정확한 밴드 유형의 파악은 불가능하였다.

< 2 -2 > 다중증폭 PCR 조건의 최적화

본 발명의서열번호 2내지서열번호 4로 기재되는 3개의 STR 부위가 모두 확인되는 다중증폭 PCR의 조건을 확립하기 위하여 DNA 중합효소의 농도, 마그네슘 이온의 농도, dNTP의 농도, 프라이머의 부착온도 및 증폭횟수의 5가지 요소가 다중 증폭 PCR에 미치는 영향을 확인하였다.

< 2 -2 -1 > DNA 중합효소 농도의 영향

본 발명의 다중 증폭 PCR에 DNA 중합효소의 농도가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 실시예 < 2 -1 >의 표준 조건에서의 PCR 조건에서 DNA 중합효소의 농도를 0.5 내지 5 유니트(unit, U)로 변화시키며 다중증폭 PCR을 수행하여 DNA 중합효소의 농도가 PCR 증폭에 미치는 영향을 확인하였다. 다중 증폭 PCR 생성물은 2% 아가로즈 겔 전기영동을 사용하여 분리하였으며 겔 상의 DNA는 EtBr을 사용하여 염색하였고 UV로 확인하였다.

그 결과, DNA 중합효소의 농도는 2 내지 2.5 U일 때 최적이었으며 더 높은 농도(3 내지 5 U)일 때는 다른 부위에 비해서 상대적으로 NeuR 생성물의 양이 증가하였고(도 6a), 효소의 농도가 높아질수록 NeuR 유전자좌의 스터터(stutter) 밴드 출현빈도가 증가하였다.

< 2 -2 -2> 마그네슘 이온 농도의 영향

본 발명의 다중 증폭 PCR에 마그네슘 이온의 농도가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 실시예 < 2 -1> 의 표준조건에서의 PCR 조건에서 마그네슘 이온의 농도를 0.5 내지 5 mM로 변화시키며 다중증폭 PCR을 수행하여 마그네슘 이온의 농도가 PCR 증폭에 미치는 영향을 확인하였다. 다중 증폭 PCR 생성물은 2% 아가로즈 겔 전기영동을 사용하여 분리하였으며 겔 상의 DNA는 EtBr을 사용하여 염색하였고 UV로 확인하였다.

그 결과, 마그네슘 이온의 농도는 프라이머 어닐링, 주형과 PCR 생성물에서 스트랜드(strand) 해리온도(dissociation temperature), 생성물의 특이성(product specificity), 프라이머 -다이머 인공물(primer -dimer artifact)의 생성 및 효소의 활성과 정확성(fidelity)등의 모든 과정에 영향을 미쳤다(Innis MA. et al.,PCR protocols, part one, 3 - 12, 1989). 마그네슘 이온의 농도가 0.5 mM로 떨어지면 3 부위 STR 유전자좌의 증폭 효율이 모두 상당히 감소하였다. 1.5 내지 2.5 mM의 농도에서는 NeuR과 D21S11 부위에서는 어떤 증폭 밴드도 나타나지 않은 반면, 5 mM의 농도에서는 Humth01 부위가 증폭되지 않았다(도 6b).

< 2 -2 -3> dNTP 농도의 영향

본 발명의 다중 증폭 PCR에 dNTP의 농도가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 실시예 < 2 -1> 의 표준조건에서의 PCR 조건에서 dNTP의 농도를 50 내지 800 μ M로 변화시키며 다중증폭 PCR을 수행하여 dNTP의 농도가 PCR 증폭에 미치는 영향을 확인하였다. 다중 증폭 PCR 생성물은 2% 아가로즈 겔 전기영동을 사용하여 분리하였으며 겔 상의 DNA는 EtBr을 사용하여 염색하였고 UV로 확인하였다.

그 결과, dNTP는 이전 기술에서는 100 μ M의 농도에서 얻어진 밴드 유형이 가장 뚜렷하고(distinct) 깨끗한(clean) 프로필을 보였지만(Song JE. et al.,Foods and Biotechnology, 6, 30 -33, 1997), 본 발명의 다중 증폭 PCR에서는 200 내지 400 μ M의 농도에서 최적을 나타내었다. 50 μ M의 농도에서는 단지 Humth01 밴드만이 매우 약하게 관찰되고 800 μ M의 농도에서는 강한 Humth01 밴드가 관찰되었다. 600 μ M 농도에서는 D21S11 밴드가 관찰되지 않음을 알 수 있었다(도 6c).

< 2 -2 -4> 프라이머 부착 온도의 영향

본 발명의 다중 증폭 PCR에 프라이머 부착 온도가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 실시예 < 2 -1> 의 표준조건에서의 PCR 조건에서 프라이머 부착 온도를 58 내지 66°C로 변화시키며 다중증폭 PCR을 수행하여 프라이머 부착 온도가 PCR 증폭에 미치는 영향을 확인하였다. 다중 증폭 PCR 생성물은 2% 아가로즈 겔 전기영동을 사용하여 분리하였으며 겔 상의 DNA는 EtBr을 사용하여 염색하였고 UV로 확인하였다.

이전 기술에서, 프라이머 부착 온도는 다중 증폭 PCR에서 가장 중요한 변수(parameter)이며 낮은 어닐링 온도는 원하는 생성물의 수율(yield)을 감소시키고 비특이적(nonspecific) 증폭을 증가시킨다고 알려져 있었는데(Wittwer CT., Garling DJ.,Biotechniques, 10, 76 -80, 1991), 본 발명자들 또한 유사한 결과를 얻었다. 모든 STR 부위가 62°C와 63°C의 프라이머 부착 온도에서 효과적으로 증폭되었으며, 62°C보다 낮은 온도에서는 NeuR 유전자좌 근처에서 인공물 밴드가 관찰되었다. 64°C에서는 Humth01 유전자좌에서 증폭 밴드가 거의 관찰되지 않았고, 65°C에서는 D21S11 유전자좌에서 관찰되지 않았다(도 6d).

< 2 -2 -5> PCR 증폭 횟수의 영향

본 발명의 다중 증폭 PCR에 증폭 횟수가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 실시예 < 2 -1> 의 표준조건에서의 PCR 조건에서 증폭 횟수를 15 내지 40회로 변화시키며 다중증폭 PCR을 수행하여 증폭 횟수가 PCR 증폭에 미치는 영향을 확인하였다. 다중 증폭 PCR 생성물은 2% 아가로즈 겔 전기영동을 사용하여 분리하였으며 겔 상의 DNA는 EtBr을 사용하여 염색하였고 UV로 확인하였다.

그 결과, 전체 생성물의 수율은 증폭주기와 직접적인 비례관계에 있었다. 30회의 증폭주기에서는 모든 STR 유전자좌가 증폭된 반면에 35회 이상에서는 단지 NeuR 유전자좌에서만 부가적인 증폭이 관찰되었다(도 6e).

상기의 결과로부터, 3곳의 STR을 모두 증폭시킬 수 있는 본 발명의 3중 증폭 PCR 반응의 최적 반응조건은 2.0 U의 T_{aq} 중합효소, 3 mM의 MgCl₂, 200 μM의 dNTP 및 10 pmole의 각각의 프라이머 세트를 포함하는 전체부피 25 μl의 반응용액에서 62°C의 어닐링 온도로 35회 증폭하는 것임을 확인하였다.

< 실시예 3> 한 가계에서의 친자검사 (paternity testing)

본 발명의 길이다형성 유전자좌를 이용한 다중증폭 PCR이 개인식별 및 친자감별에 유용하게 사용될 수 있는지 확인하기 위하여, 한 가계에서 본 발명의 서열번호 1로 기재되는 VNTR 유전자좌 YNZ22와 서열번호 2내지서열번호 4로 기재되는 3곳의 STR 유전자좌를 다중증폭 PCR로 증폭하여 친자검사를 수행하였다. 양친과 두명의 딸 그리고 한명의 아들에게서 본 발명의 서열번호 2내지서열번호 4로 기재되는 3곳의 STR 유전자좌를 실시예 < 2 -2 >에서 얻은 최적의 조건으로 PCR을 수행하였다.

그 결과, YNZ22 유전자좌에 있어서 아버지는 313 bp 크기의 대립유전자와 383 bp 크기의 대립유전자를 가지고 있으며 어머니는 383 bp 크기의 대립유전자 하나만을 가지고 있음을 확인하였다. 양친의 유전자형의 조합으로부터 자손 1, 2, 3의 유전자형을 확인한 결과, YNZ22 부위에 있어서 두명의 딸(레인 1 및 레인 2)은 아버지에게서 313 bp 크기의 대립유전자를 물려받았고 어머니에게서 383 bp 크기의 대립유전자를 물려받았으며, 아들(레인 3)은 313 bp 크기의 대립유전자 밴드만이 관찰되므로 양친으로부터 모두 313 bp 크기의 대립유전자를 물려받았음을 알 수 있었다(도 7a).

서열번호 2내지서열번호 4로 기재되는 3곳의 STR 유전자좌에 대한 다중 증폭 PCR을 수행한 결과(도 7b), NeuR 유전자좌에 있어서 아버지는 363 bp 크기의 대립유전자와 367 bp 크기의 대립유전자를 가지고 있으며 어머니는 359 bp 크기의 대립유전자와 383 bp 크기의 대립유전자를 가지고 있음을 확인하였다. 레인 1의 딸은 아버지로부터 367 bp 크기의 대립유전자와 어머니로부터 383 bp 크기의 대립유전자를 물려받았고, 레인 2의 딸은 아버지로부터 367 bp 크기의 대립유전자와 어머니로부터 359 bp 크기의 대립유전자를 물려받았으며, 레인 3의 아들은 아버지로부터 363 bp 크기의 대립유전자와 어머니로부터 359 bp 크기의 대립유전자를 물려받았음을 알 수 있었다.

D21S11 유전자좌에 있어서 아버지는 230 bp 크기의 대립유전자와 238 bp 크기의 대립유전자를 가지고 있으며 어머니는 226 bp 크기의 대립유전자와 234 bp 크기의 대립유전자를 가지고 있음을 확인하였다. 레인 1과 레인 2의 두 딸은 아버지로부터 230 bp 크기의 대립유전자와 어머니로부터 226 bp 크기의 대립유전자를 물려받았으며, 레인 3의 아들은 아버지로부터 238 bp 크기의 대립유전자와 어머니로부터 226 bp 크기의 대립유전자를 물려받았음을 알 수 있었다.

Humth01 유전자좌에 있어서 아버지는 142 bp 크기의 대립유전자와 158 bp 크기의 대립유전자를 가지고 있으며 어머니는 142 bp 크기의 대립유전자 하나만을 가지고 있음을 확인하였고 레인 1 내지 레인 3의 모든 자손들이 아버지로부터 158 bp 크기의 대립유전자와 어머니로부터 142 bp 크기의 대립유전자를 물려받았음을 알 수 있었다.

이상의 결과로, 3가지의 서로 다른 길이다형성 DNA 염기서열을 최적화된 다중 증폭 PCR을 이용하여 친자감별을 수행한 결과 예상했던 바와 같이 부모의 일부의 대립유전자의 조합에 의해서 자손들의 유전자가 형성됨을 확인하였고, 따라서 본 발명의 길이다형성 DNA 염기서열을 이용한 다중증폭 PCR이 개인식별이나 친자감별에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 길이다형성 DNA 염기서열을 이용한 다중 증폭 PCR의 최적 반응 조건을 제공함으로써 개인식별 및 친자감별을 수행하는데 있어서 예전의 여러 개의 유전자부위를 각각 개별적인 PCR에 의해 조사한 방법과 달리 3가지의 유전자 부위를 다중 증폭 PCR을 이용하여 동시에 증폭시킴으로써 길이다형성 DNA 염기서열을 이용한 개인식별과 친자감별을 수행하는데 소모되는 비용과 시간을 절약할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- 1) 피검자의 DNA를 추출하는 단계;
- 2) 상기 DNA를 주형으로 길이다형성 유전자에 대한 다중 증폭 PCR을 수행하는 단계; 및
- 3) 증폭된 DNA의 물리화학적 특성을 측정하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 개인식별 및 친자감별 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 단계 2의 길이다형성 유전자는 염색체 상의 이형접합 비율이 높고 대립형의 수가 많으며 고르게 분포하고 다형성 정보 용량 (polymorphism information content, PIC) 값이 1에 가까우며 PCR 생성물들의 크기가 전기 영동을 하였을 때 서로 구분이 될 수 있을 만큼 충분히 차이가 나는 것을 특징으로 하는 개인식별 및 친자감별 방법.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 길이다형성 유전자는 서열번호 2로 기재되는 뉴로텐신 수용체 유전자 (neurotensin receptor gene, NeuR), 서열번호 3으로 기재되는 D21S11 또는 서열번호 4로 기재되는 인간 티로신 하이드록실라제 유전자 (human tyrosine hydroxylase gene, Humth01)의 STR 부위를 다중증폭 PCR에 사용하는 것을 특징으로 하는 개인식별 및 친자감별 방법.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 기재되는 유전자에 해당하는, 각각 서열번호 7 및 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10 또는 서열번호 11 및 서열번호 12로 기재되는 프라이머 세트를 다중증폭 PCR에 사용하는 것을 특징으로 하는 개인식별 및 친자감별 방법.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 단계 3에서 DNA의 물리화학적 특성은 염기서열의 특성 분석 또는 염기서열의 결정에 의해 측정되는 것을 특징으로 하는 개인식별 및 친자감별 방법.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 염기서열의 특성은 PCR에 의해 DNA 절편의 길이를 측정하는 검사, 보합 (hybridization)을 측정하는 검사, 전기영동성 (electrophoretic mobility)을 측정하는 검사 및 질산은 염색으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 개인식별 및 친자감별 방법.

청구항 7.

제 1항에 있어서, 단계 2의 길이다형성 유전자에 대한 다중 증폭 PCR에서 DNA 중합효소의 농도, 마그네슘 이온의 농도, dNTP의 농도, 프라이머의 부착온도 및 증폭횟수의 5가지 요소를 변화시켜 최적의 PCR 반응조건을 구하는 것을 특징으로 하는 개인식별 및 친자감별 방법.

청구항 8.

제 7항에 있어서, 다중 증폭 PCR의 최적의 반응조건은 2.0 내지 2.5 U의 DNA 중합효소, 3.0 내지 4.5 mM의 MgCl₂, 200 내지 400 μM의 dNTP, 62 내지 63°C의 서열번호 7 내지 서열번호 12로 기재되는 각각의 프라이머의 부착온도 및 30 내지 35회의 증폭횟수인 것을 특징으로 하는 개인식별 및 친자감별 방법.

청구항 9.

제 1항의 방법을 이용한 개인식별 및 친자감별용 DNA 타이핑 키트.

청구항 10.

제 9항에 있어서, DNA 타이핑 박 또는 DNA 타이핑 칩과 항원 단백질, 적당한 완충용액, 표준항체, 발색효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색기질 및 DNA 제한효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 타이핑 키트.

청구항 11.

제 10항에 있어서, 발색효소는 퍼옥시 데이즈(peroxidase), 알칼라인 포스파테이즈(alkaline phosphatase) 및 갈락토시 데이즈(galactosidase)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 DNA 타이핑 키트.

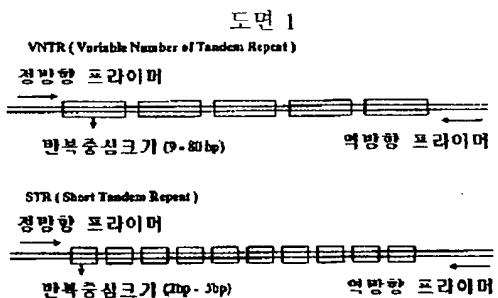
청구항 12.

제 10항에 있어서, 형광물질은 FITC, TRITC 및 [F -18] -FDG로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 DNA 타이핑 키트.

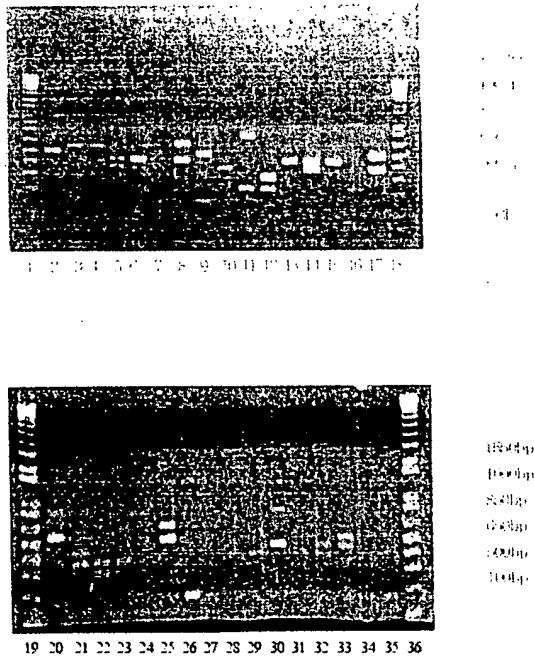
청구항 13.

제 10항에 있어서, 발색기질은 4CN(4-chloro -1-naphthol), DAB(diaminobenzidine), AEC(aminoethyl carbazole), ABTS[2, 2'-azino -bis (3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid)], OPD(o-phenylenediamine) 및 TM B(tetramethyl benzidine)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 DNA 타이핑 키트.

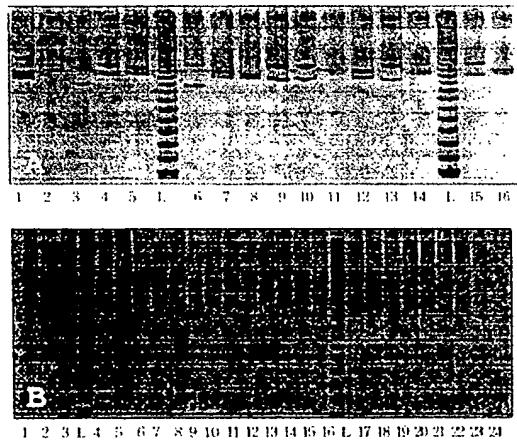
도면



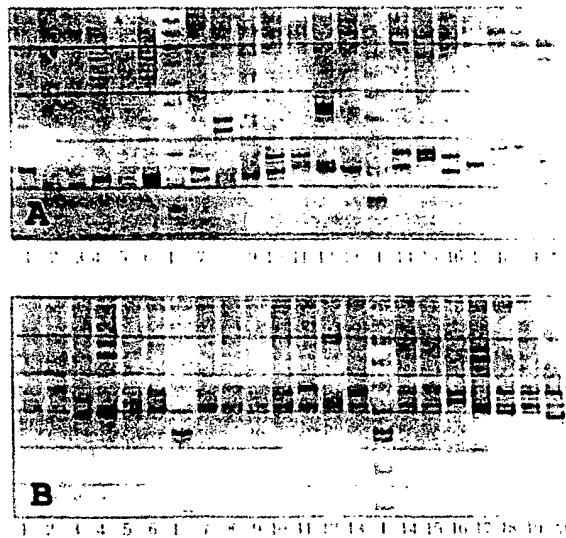
도면 2



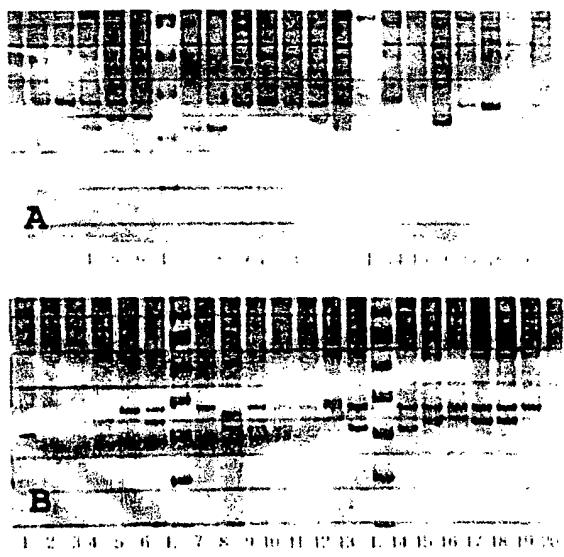
도면 3a



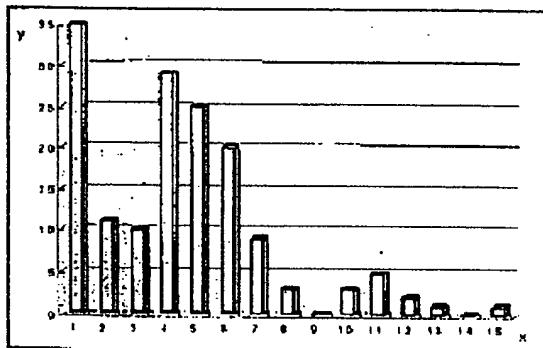
도면 3b



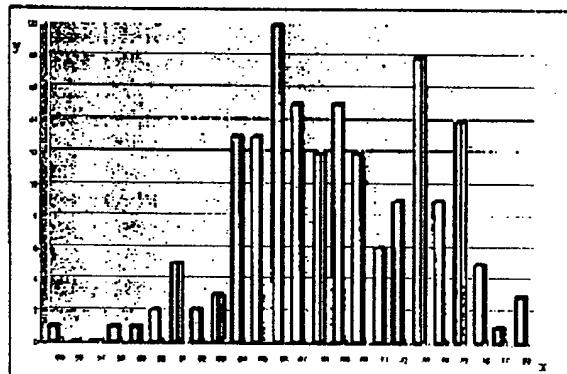
도면 3c



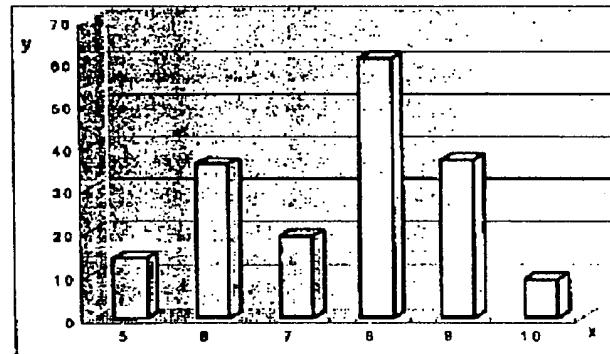
도면 4a



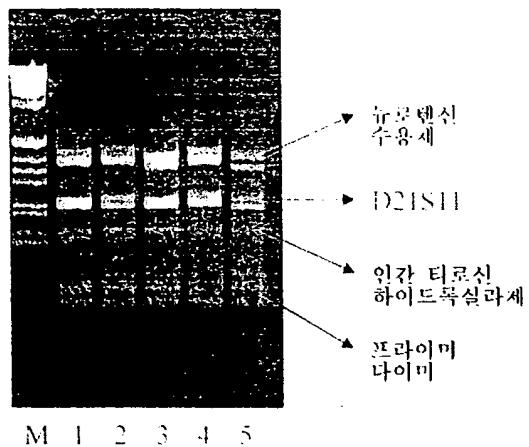
도면 4b



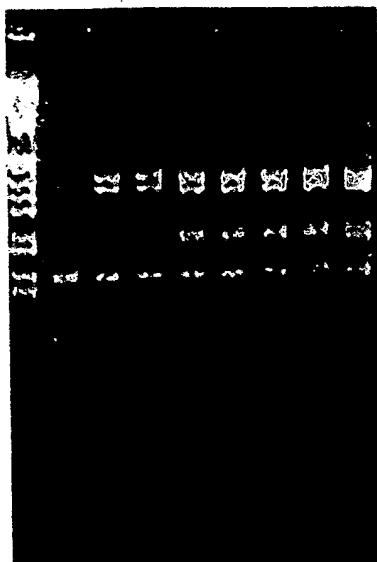
도면 4d



도면 5

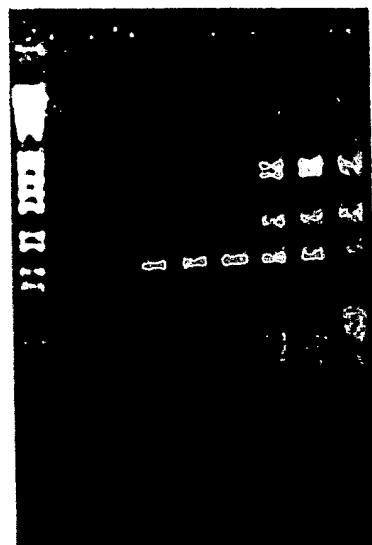


도면 6a



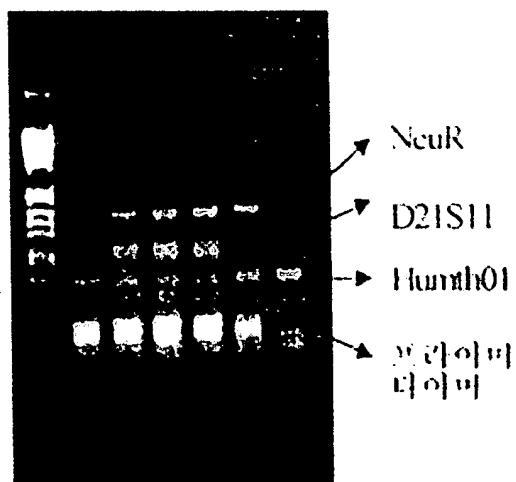
1 2 3 4 5 6 7 8 9

도면 6b



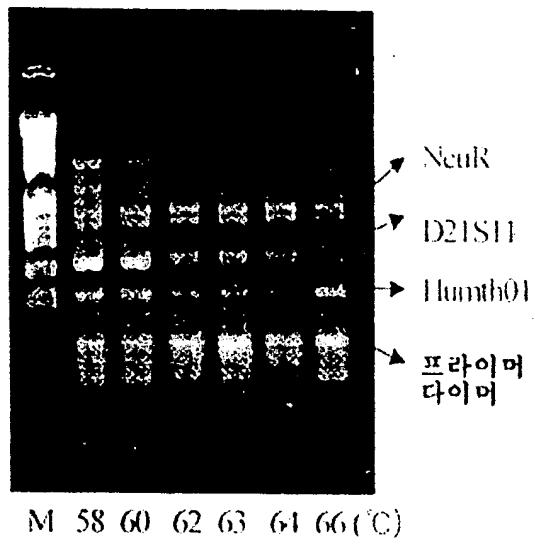
1 2 3 4 5 6 7 8 9

도면 6c

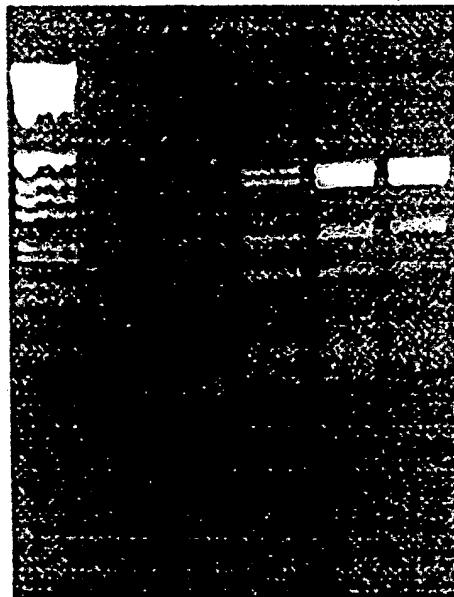


1 2 3 4 5 6 7

도면 6d



도면 6e

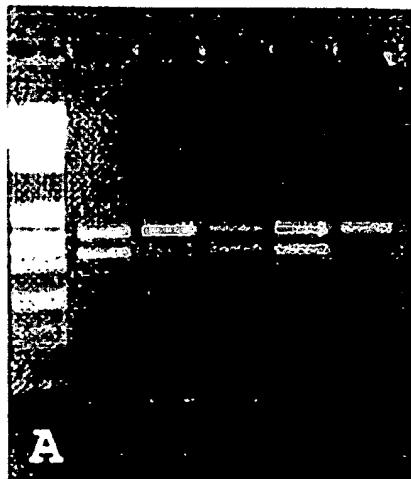


M 15 25 30 35 40 (회)

도면 7a

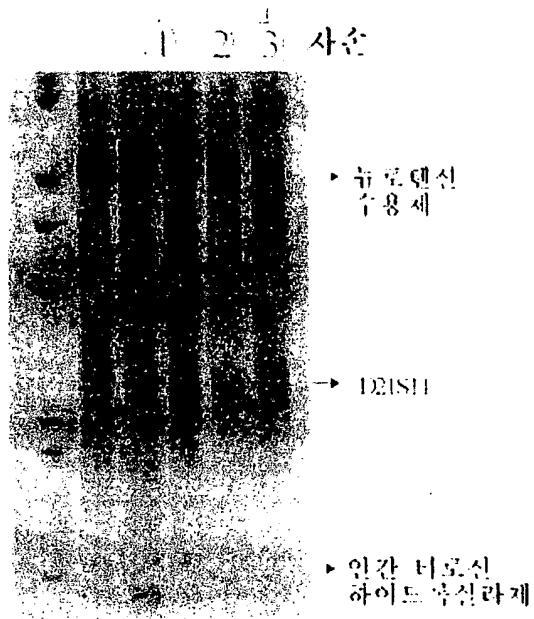
양친

① ② ③ 자손



도면 7b

양진



<110> Inha University
 <120> Method of personal identification and paternity testing by optimizing
 conditions of multiplex PCR using length-polymorphic DNA sequence
 <160> 12
 <170> KopatentIn 1.55
 <210> 1
 <211> 173
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VNTR region of YNZ22
 <400> 1
 ggtcgaagag tgaagtgcac aggagggcaa ggccggccctc agactgcctg ggctggggca 60
 gggctgttag accctccctt acagaagcaa tgagggttg aggaggggt tagggcagt 120
 aagtttaacctt gggaggcgaa tgtggggaa cgctgaagaa taaagactgt ggg 173
 <210> 2
 <211> 119

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> SPR region of neuropeptide Y receptor gene
 <400> 2
 catcagctca gaaggcgtggc tcttccttcc tccttccttc ctttccttcc 60
 tccttccttc cttccttcaa ctttcttct ctctgtctta gacatggagt tcttgctt 119
 <210> 3
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> SPR region of D21S11
 <400> 3
 atgtgagtca attccccaa tgaattgtt tctaatacgac tatcttatcca gtcttatctac 60
 ntcctatnna gtctgtctt ggagaacatt gactaataaca ac 102
 <210> 4
 <211> 127
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> SPR region of human tyrosine hydroxylase gene
 <400> 4
 tgattcccat tggcctgttc ctcccttatt tccctcattc accatggagt ctgtgttccc 60
 tgtgacctgc actcggaaac cctgttaca gggagctgtg tggccaggc tggataaaatc 120
 gggagct 127
 <210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer of YNZ22
 <400> 5
 ggtcgaagag tgaagtgcac ag 22
 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> reverse primer of YNZ22
 <400> 6
 cgctgaagaa taaagactgt ggg 23
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer of NeuR
 <400> 7
 catcagctca gaaggcgtggc gt 22

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> reverse primer of NeuR
<400> 8
ttagacatgg agttcttgct ct 22
<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> forward primer of D21S11
<400> 9
atgtgagtca attccccaaag tga 23
<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> reverse primer of D21S11
<400> 10
ctggagaaca ttgactaata caac 24
<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> forward primer of Humth01
<400> 11
tgattcccat tggcctgttc ct 22
<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> reverse primer of Humth01
<400> 12
caggctggat aaatcgggag ct 22